

## 明 細 書

ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する  
殺菌剤

## 技術分野

[0001] この発明は、虫歯原因菌であるストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)及びストレプトコッカス・ソブリヌス(*Streptococcus sobrinus*)に対して溶菌作用を有する酵素に関し、更に、この酵素を用いた虫歯治療方法や予防方法、更に、虫歯治療又は虫歯予防を目的としてこの酵素を用いた歯みがき剤、ガムなどに関する。

## 背景技術

[0002] ヒトに齲食を起こすいわゆる齲食原因菌は無菌ラットを用いた実験的研究ならびに数々の疫学的研究から連鎖球菌群に属する*Streptococcus mutans*と*S. sobrinus*であることが明らかにされている(非特許文献1)。本発明者らは細菌が保有する巨大構造物ペプチドグリカン代謝分解する酵素(溶菌酵素)を研究する過程で*S. mutans*が産生する溶菌酵素に着目し、研究をすすめている(非特許文献2)。ペプチドグリカンは生物の中で真性細菌及び古細菌のみが有する構造物で、糖鎖とペプチド鎖がおりなすメッシュワーク構造をとり、菌体を包み込み、約20気圧といわれる内圧を受け止めて細菌の形を保持するための骨格にあたる構造である。ペプチドグリカンはその特異性から、古くから抗菌化学療法剤の標的と関連づけて考えられてきた。いわゆる抗生物質の端緒となったペニシリンGに始まるβ-ラクタム系薬剤を始め、多くの抗菌化学療法剤はペプチドグリカン生合成系に作用する薬物である。動物細胞が薬剤標的を持たないことからβ-ラクタム系薬剤は優れた選択毒性を示し、副作用の少ない薬剤として汎用されてきた。

一方、馬場久衛らは、*S. mutans*が産生する本件に近似の酵素AL-7に関し発表しており(非特許文献3-5)、この酵素AL-7が*S. Sanguis*及び*S. mutans*の加熱菌体を選択的に溶解することを明らかにしている。

これら以外にも、*S. mutans*の産生する酵素に関していくつかの例が知られている(

特許文献1〜2等)。

[0003] 特許文献1:特開平10-136976

特許文献2:特開2002-114709

非特許文献1:日本細菌学雑誌 51(4): 931-951, 1996

非特許文献2:日本細菌学雑誌 52(2): 461-473, 1997

非特許文献3:J. Oral Biol.,25:947-955, 1983

非特許文献4:J. Oral Biol.,26:185-194, 1984

非特許文献5:神奈川歯学,24-2, 384-392, 1989

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 従来、抗菌化学療法のかえ方として薬剤が多くの細菌に共通の標的を持ち、これらに致死的に働くことが望ましいとされてきた。しかしながら、このような作用は化学療法の対象とする細菌のみならず、常在細菌叢を形成している細菌群にも影響し、菌交代症を引き起こすこと、さらに細菌が耐性を獲得した際には、耐性が菌種を超えてまたたく間に広がることが周知されるようになる。そのため、従来の抗菌剤とは異なり、特定の菌種にのみ働く抗菌化学療法薬の利用が模索されている。

即ち、本発明は、齲食原因菌を選択的に攻撃する酵素、及びこの酵素を用いた虫歯治療・予防法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 溶菌酵素は本来、細菌が分裂・細胞分離して増殖する過程でペプチドグリカンを代謝するために必要とされる酵素である。本発明者らは研究の過程で*S. mutans*が産生する溶菌酵素Lyt100を見出し、その遺伝子クローニング、組換体を作成し、酵素の作用を検討してきた。その中で本酵素の基質特異性を検討する過程で、本酵素が*S. mutans*ならびに*S. sobrinus*を選択的に溶解する基質特異性を有することを見出した。*S. mutans*と*S. sobrinus*を選択的に溶解する酵素は口腔内の常在細菌叢に影響することなく、これら齲食原性細菌を溶解する優れた点を有する。本酵素を利用することで、口腔内の食齲原性細菌を選択的に除去、あるいはその菌数を減少させることが可能となり、齲食の予防効果を発揮させることができる。

[0006] 即ち、本発明は、下記(1)～(3)のいずれかのタンパク質から成るストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する殺菌剤である。

(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部(例えば、全アミノ酸の5%)が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動(zymography)において $100 \pm 10$  kDaに溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号2に示す塩基配列から成るDNA又は(1)のタンパク質をコードするDNAにより形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

また本発明は、この殺菌剤を含有する虫歯予防剤、虫歯治療剤、歯みがき剤、口ゆすぎ剤、又は虫歯予防用ガムである。これらを処方するに当たっては、各分野の常法に従って行えばよい。

[0007] 更に本発明は、下記(1)～(3)のいずれかのタンパク質を用いてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを選択的に殺菌する方法である。

(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動(zymography)において $100 \pm 10$  kDaに溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号2に示す塩基配列から成るDNA又は(1)のタンパク質をコードするDNAにより形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

発明を実施するための最良の形態

[0008] 本発明の酵素Lyt100は、*S. mutans*が産生する本件に近似の酵素AL-7(非特許文献3)とは異なる。まずAL-7は菌体外酵素でありLyt100は菌体内酵素である。更に、アッセイ系としてほぼ同じ条件で測定し、AL-7は20mgの酵素標品を用いて、*S. mutans* あるいは*S. sobrinus*に対し、加熱死菌で最大17%、20.6%の溶菌活性を示し、細胞壁に対し6%、8.3%の溶解活性を示す。これに対しLyt100は3  $\mu$ gの酵素標品を用いて*S. mutans*と*S. sobrinus*に対し加熱死菌で最大23%、33.6%の溶菌活性を

示し、細胞壁に対し96.7%、96.7%の溶解活性を示す。細胞壁に対する溶解活性が強い。一方、生菌に対してはAL-720mgの酵素標品を用いて、*S. mutans*に対し最大3.2%、*S. sanguis*に対して3.3%とほとんど溶菌を示さずかつ種特異性を示さないのに対し、Lyt100は10  $\mu$  gの酵素標品を用いて*S. mutans*と*S. sobrinus*に対し44%、56%、*S. sauguis*, *S. salivarius*, *S. mitis*に対して0%と特徴的で*S. mutans*及び*S. sobrinus*に対し強い種特異的溶菌活性を示す。

本発明の酵素Lyt100は、病原菌(*S. mutans*)が持つ酵素であり、同じ病原菌自身を溶菌／殺菌する。しかも種特異性が高く他の菌層に影響を与えないため、虫歯の治療／予防に利用出来る。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

## 実施例 1

### [0009] (1) 粗酵素標品の調整

*Streptococcus mutans* MT703R株を600 ml ブレインハートインフュージョン培地にて37℃、一晚振倒培養後、8,000 x g, 20 min遠心分離し、沈渣を得た(約1.2 g)。沈さに2 ml, 8M ureaを加え、懸濁し室温で30分間放置した。15,000 x g, 15 min遠心分離にかけ、上澄みを得る。得られた上澄みを限外ろ過膜(Amicon)を用いて濃縮した。最終的に1 mg/mlとして、これを粗酵素標品として用いた。

### [0010] (2) 溶菌酵素Lyt100の発見

粗酵素標品を酵素電気泳動(Zymography)にかけた。酵素電気泳動は、溶菌酵素の活性を検出するために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を応用した方法である。まずポリアクリルアミドゲルを重合させる際に、*S. mutans*死菌体(1 mg/ml)を添加してゲルを固める。その後、通常の電気泳動と同様に泳動を行った後、取り出したゲルを水洗し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)でインキュベートすることにより、ゲル中の溶菌酵素が活性を回復し、タンパク質バンドに相当する位置の菌体を溶解し、結果として白濁したゲルの中で透明なバンドとして検出できる。得られたゲルをZymogramという。

*S. mutans*死菌体は、培養した*S. mutans*を約100℃の熱水／4%SDS中で30～60分処理したのち十分量のPBSで10回程度洗浄したものをを用いることができる。

[0011] この結果、図1に示すように、高分子量域に2本の溶菌バンドが認められた。粗酵素標品をSDS-電気泳動にかけた後、ゲル中のタンパク質をクマシーブリリアントブルーで染色し、先のZymogramと比較検討することから溶菌バンドに対応するタンパク質バンドを見極めた。そのタンパク質バンド2本(ふたつの溶菌活性に対応)を含むゲルを切り出し、ナイロン膜に転写し、気相アミノ酸シーケンサー(Model 49X Procise)にかけた。得られたアミノ酸配列(配列番号1)をもとにTIGR unfinished *Streptococcus mutans* UAB159 DNA sequence databaseを用いて、対応するアミノ酸配列に相当する塩基配列(配列番号2)を含有するDNA断片を見出した。

得られた二つのDNA断片は、同じタンパク質をコードしており、一方は合成されたタンパク質が分泌された後に、菌体上で他のタンパク質分解酵素によって限定分解を受けた結果生じた産物であることが明らかとなった。すなわち、Lyt100は24個のシグナル配列を持ち、成熟型で104.424 kDa、そののちアミノ末端側182残基が限定分解を受けてはずれ、89.680 kDaとなることが明らかになった。

この全長のタンパク質をコードしているDNAをもとにプライマーを作成し(配列番号3、4)、*S. mutans* C67-1染色体を鋳型として成熟型酵素タンパク質をコードしているDNAを増幅した。このDNAを発現ベクターpQE30に組み込み、*E. coli* M-15を形質転換した。得られた形質転換体の一つをGY122と名付けた。

[0012] (3) 組み換え型溶菌酵素Lyt100の精製

大腸菌GY122株を500mlのLB液体培地で培養し(約4時間)、吸光度660 nmが0.5の時点でイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを最終濃度1 mMとなるように添加した。さらに3時間培養し、培養液を遠心分離にかける。8,300 g x 30 minで遠心分離し、沈渣をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し(菌体1gに対し10 ml)、懸濁、遠心分離の操作を2回繰り返す。再度得られた沈渣をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し(菌体1gに対し10 ml)、氷冷下で超音波破碎(TOMY Seiko level 4, 50%間隔, 20 min)し、破碎標品を遠心分離した。沈渣に0.2% Triton X-100 含有PBSを加え懸濁し(沈渣1gに対し10 ml)、室温で30 min放置した。再度、この操作を繰り返し、得られた沈渣を8M urea, 0.1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M Tris-Cl (pH8.0)に溶解した。得られた溶液をNi-NTA レジンビーズ(1 ml)に添加し、8-10倍量の8M urea, 0.1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M

Tris-Cl (pH6.3)で洗浄した。その後、8M urea, 0.1M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0.01 M Tris-Cl (pH5.4)で溶出し、1分画500  $\mu\text{l}$ で15〜20分画を採取した。各分画を溶菌アッセイにかけ、活性分画を集め、1M NaCl, 1M urea含有0.1M リン酸緩衝液によって4℃で一晩透析した。透析した標品をあらかじめ1M NaCl, 1M urea含有0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0 (A buffer)で平衡化した高速液体クロマトグラフィー用カラム TSKgel Pheny-5PW(75 mm×7.5 mm, lot 5PHR0050)に添加し、十分量の上記緩衝液で洗浄後、A bufferからB buffer (1M urea含有0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0)へ流速0.5 ml/minで30分間の直線グラジエント溶出を行った。図2に示すように活性は実線で示す位置に溶出される。

図3に精製前ならびに精製後の標品のSDS-電気泳動像を示す。Lyt100は約100 kDa (100±10kDa)の位置に泳動され、目的のタンパク質が精製できたことを示している。

## 実施例 2

### [0013] (4) 死菌体を用いた溶菌活性の測定

口腔レンサ球菌として以下の5株を用いた。S. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176a, S. mitis ATCC9811, S. sanguis ATCC10436, S. salivarius ATCC9222。

4%SDS添加煮沸水中で加熱処理した死菌体を十分量の水で洗浄し、あらかじめ Turbidity buffer (0.1 M リン酸緩衝液、0.1 M NaCl, 1 mM Ca, pH 6.8)で懸濁し吸光度660 nm=0.3 に調整した。菌懸濁液2 mlに精製Lyt100を添加し、時間経過とともに吸光度の変化を測定した。

死菌体の溶解活性を図4〜6に示す。Lyt100はS. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176aに対して強い溶菌活性を示し、特にS. sobrinus OMZ176aに対してはS. mutans C67-1と比較して倍の活性を示した。

## 実施例 3

### [0014] (5) 生菌体を用いた溶菌活性と殺菌作用の測定

口腔連鎖球菌として以下の5株を用いた。S. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176a, S. mitis ATCC9811, S. sanguis ATCC10436, S. salivarius ATCC9222。

培養した菌をそれぞれTurbidity bufferに懸濁した。あらかじめ、連鎖を分散させる

ため、*S. mutans* については超音波破碎機でlevel 4, 10 sec処理、他の菌種はlevel 4, 5 sec処理したのち吸光度660nm-0.5に調整した。菌懸濁液2 mlに精製Lyt100 を添加し、時間経過とともに吸光度の変化を測定した。また同時期にサンプルを採取し、104-105倍希釈したものを*S. mutans* C67-1, *S. sobrinus* OMZ176a, *S. salivarius* ATCC92222についてはブレインハートインフュージョン寒天培地、*S. mitis* ATCC9811, *S. sanguis* ATCC10436についてはMS寒天培地に播き、コロニー数を計算した。

- [0015] 生菌体の溶解活性を図7, 8に示す。一般的に生菌は死菌に比較して酵素に対して感受性が低くなる。Lyt100は死菌体のアッセイでは3  $\mu$ g/2 mlで用いたが生菌体のアッセイでは10  $\mu$ g/2mlで使用した。この場合もLyt100は*S. mutans* C67-1と*S. sobrinus* OMZ176aに強い溶菌活性を示した。

生菌体の致死活性を図9, 10に示す。Lyt100処理した生菌の懸濁液よりcolony forming unitを算出した結果、濁度の低下とほぼ同様の傾向を示し、Lyt100は*S. mutans* C67-1と*S. sobrinus* OMZ176aに選択的な殺菌効果を示すことが明らかとなった。

#### 図面の簡単な説明

- [0016] [図1]本発明の酵素Lyt100のZymogramを示す図である。
- [図2]本発明の酵素Lyt100の、TSKgek Phenyl-5PWを用いたカラムクロマトグラフィーを示す図である。下線は溶菌活性を持つ領域を示す。
- [図3]精製標品の電気泳動及びZymogramを示す図である。
- [図4]本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度(通常660nmの吸光度)、横軸は時間(分)を示す。
- [図5]本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度(通常660nmの吸光度)、横軸は時間(分)を示す。
- [図6]本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。180分の時点での濁度を、*S. mutans*を基質とした時を100%として、示す。
- [図7]本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度(通常660nmの吸光度)、横軸は時間(分)を示す。

[図8]本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する溶菌活性を示す図である。180分の時点での濁度を、*S.mutans*を基質とした時を100%として、示す。

[図9]本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する致死活性を示す図である。縦軸はコロニー(生きた菌の数)、横軸は時間(分)を示す。

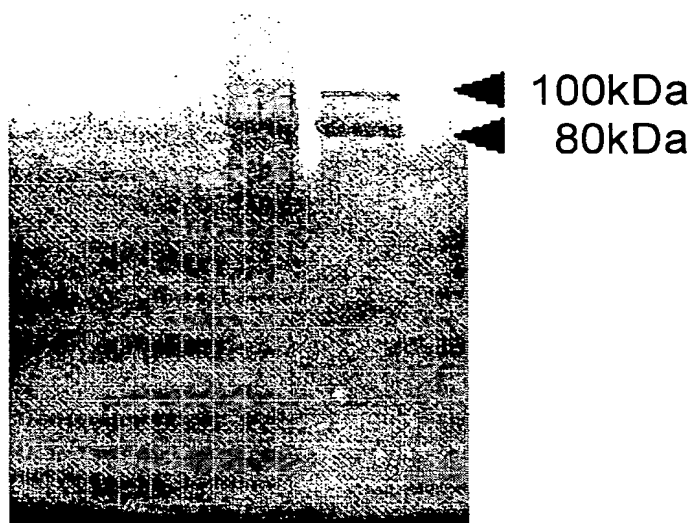
[図10]本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する致死活性を示す図である。縦軸はコロニー(生きた菌の数)、横軸は時間(分)を示す。



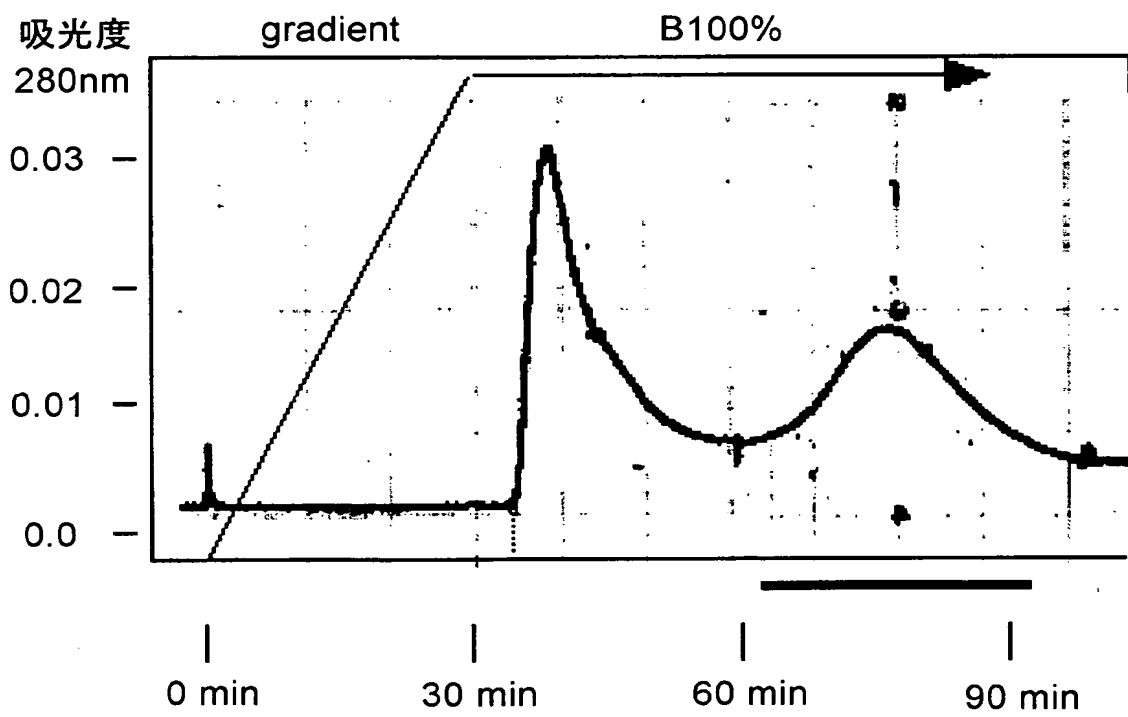
## 請求の範囲

- [1] 下記(1)ー(3)のいずれかのタンパク質から成るストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する殺菌剤。
- (1) 配列番号1に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質
- (2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動(zymography)において $100 \pm 10$ kDaに溶菌バンドを示すタンパク質
- (3) 配列番号2に示す塩基配列から成るDNA又は(1)のタンパク質をコードするDNAにより形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質
- [2] 請求項1に記載の殺菌剤を含有する虫歯予防剤、虫歯治療剤、歯みがき剤、口ゆすぎ剤、又は虫歯予防用ガム。
- [3] 下記(1)ー(3)のいずれかのタンパク質を用いてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを選択的に殺菌する方法。
- (1) 配列番号1に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質
- (2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動(zymography)において $100 \pm 10$ kDaに溶菌バンドを示すタンパク質
- (3) 配列番号2に示す塩基配列から成るDNA又は(1)のタンパク質をコードするDNAにより形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

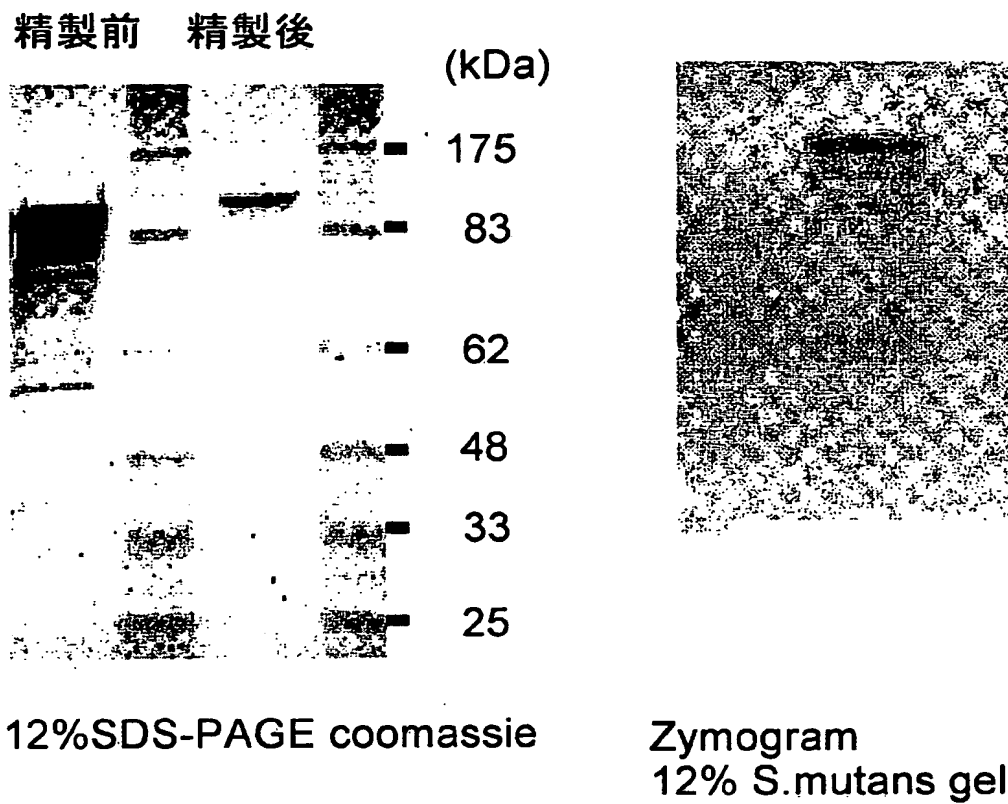
[図1]



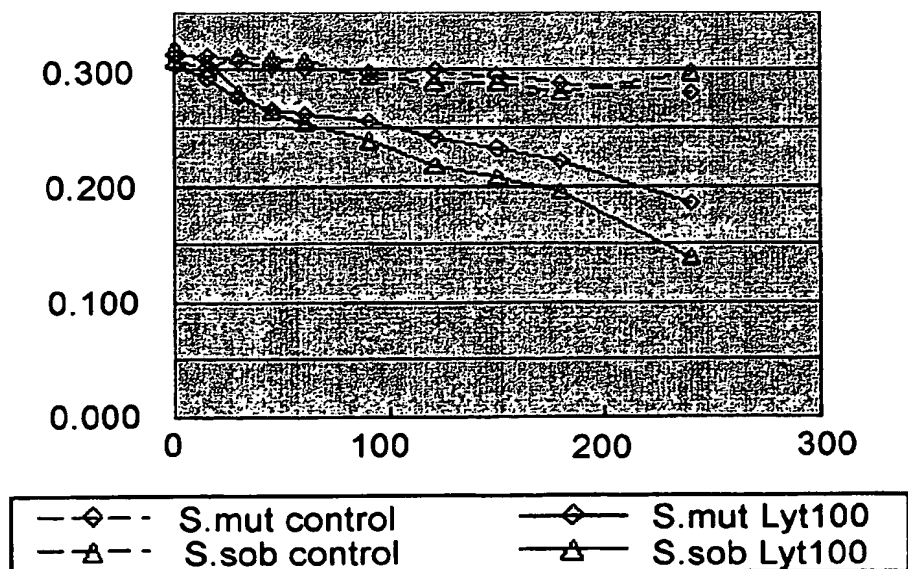
[図2]



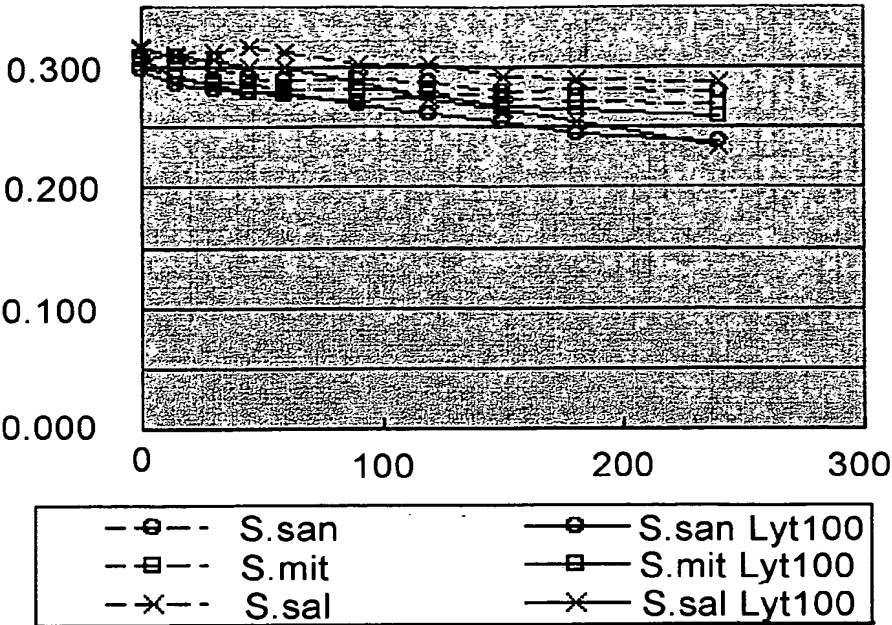
[図3]



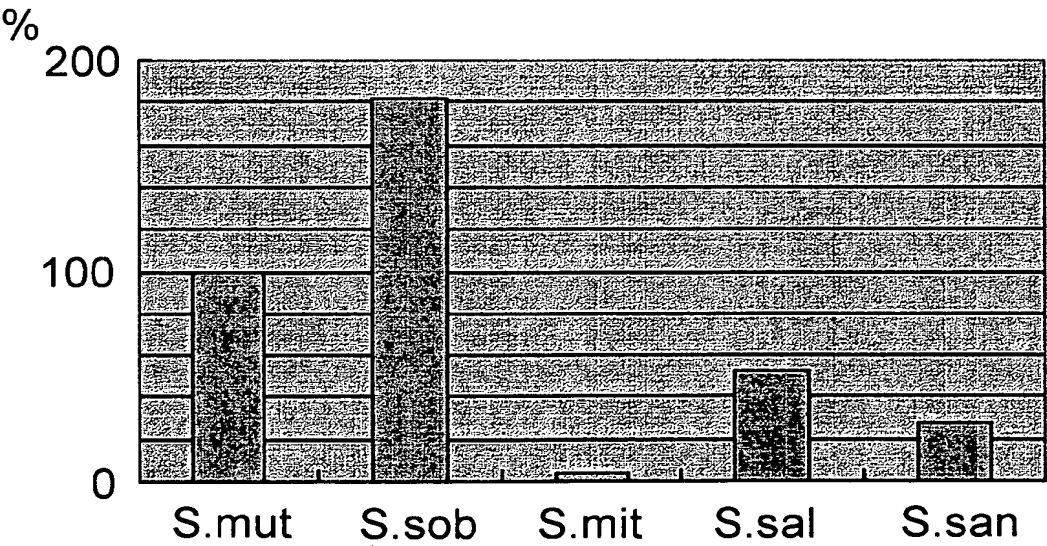
[図4]



[図5]

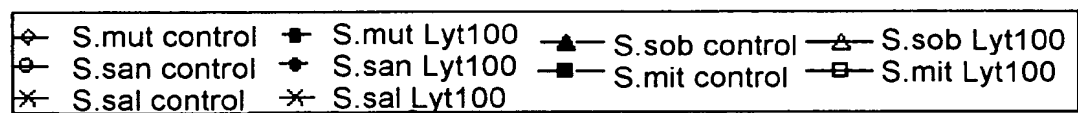
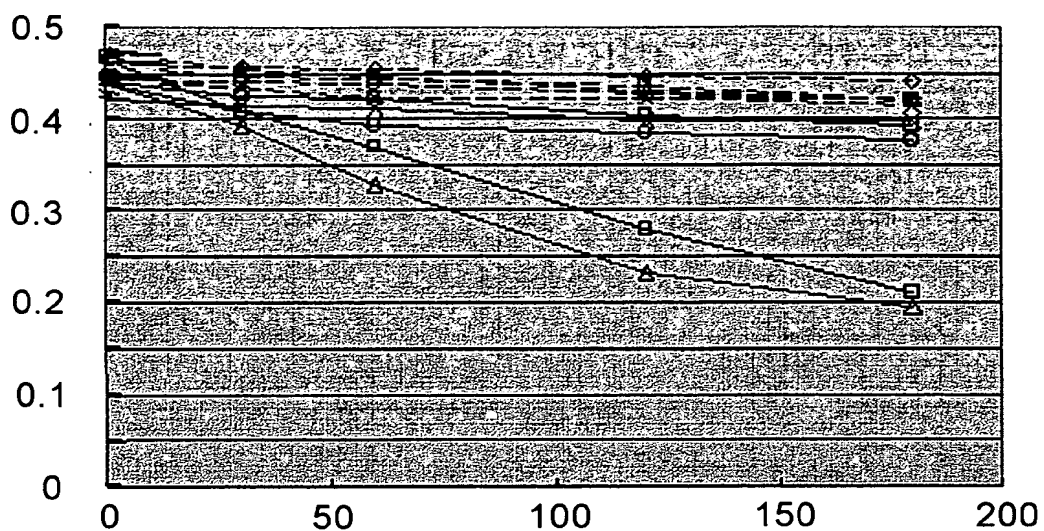


[図6]

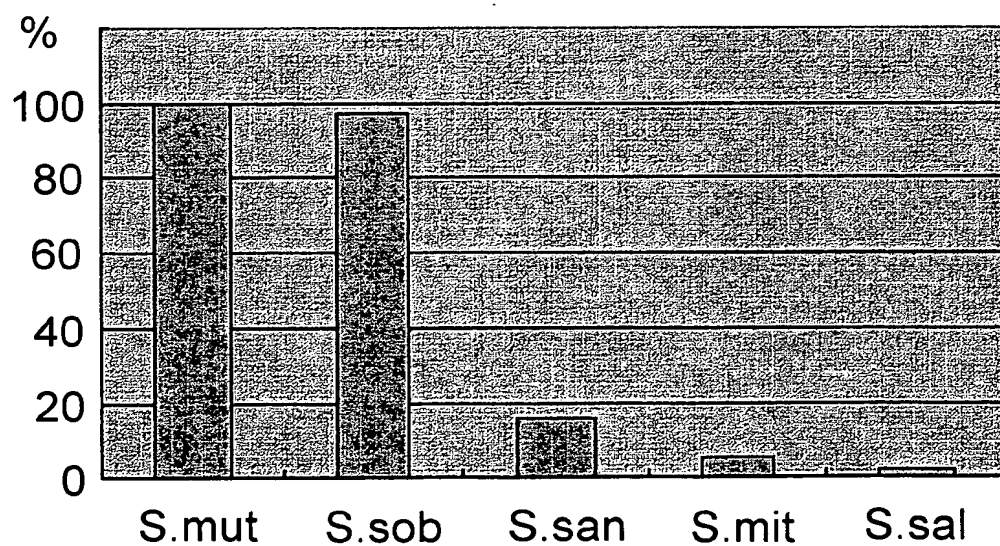


[図7]

濁度

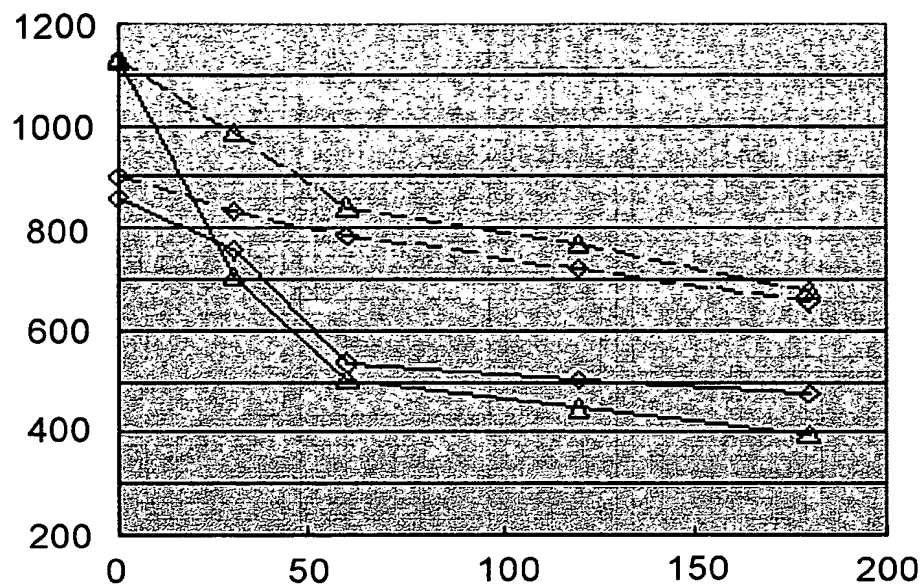


[図8]



[図9]

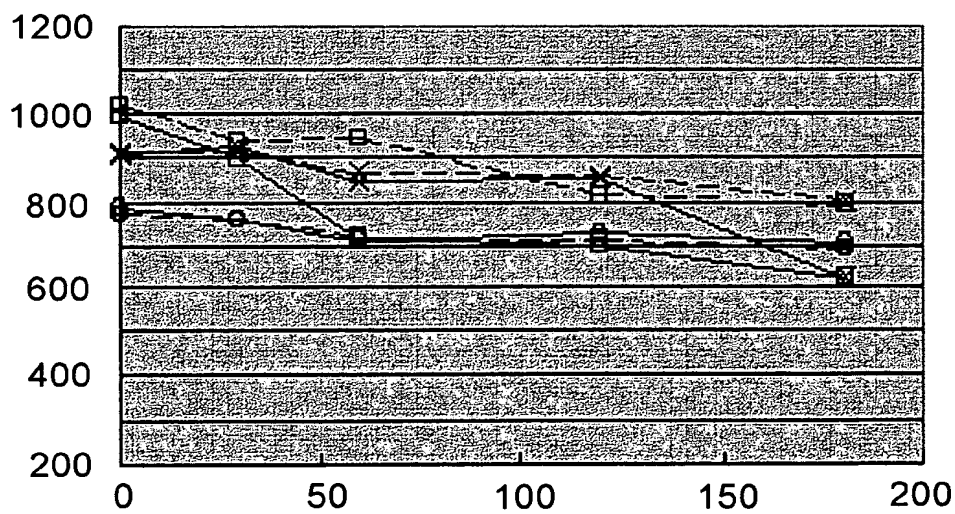
colony



---◇---	<i>S. mut</i> control	—◇—	<i>S. mut</i> Lyt100
---△---	<i>S. sob</i> control	—△—	<i>S. sob</i> Lyt100

[図10]

colony



---●---	<i>S. san</i> control	—●—	<i>S. san</i> Lyt100
---□---	<i>S. mit</i> control	—□—	<i>S. mit</i> Lyt100
---×---	<i>S. sal</i> control	—×—	<i>S. sal</i> Lyt100

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017682

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, 7/16, 7/28, A61P1/02, 31/04//C12N15/56, 9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, 7/16, 7/28, C12N15/56, 9/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, REGISTRY/CAPLUS/  
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AJDIC, D. et al., Genome Sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen, Proc.Natl.Acad.Sci., 2002, Vol.99, No.22, pages 14434 to 14439	1, 2
A	WO 02/77183 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text (Family: none)	1, 2
A	JP 10-136976 A (Kabushiki Kaisha Purumuwon), 26 May, 1998 (26.05.98), Full text (Family: none)	1, 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 February, 2005 (16.02.05)

Date of mailing of the international search report  
08 March, 2005 (08.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017682

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yoshihiro NOZAKI, "Streptococcus mutans no Sansei suru Kin Taigai Koso ni yoru Koku Rensa Kyukin no Yokai ni Kansuru Kenkyu", Kanagawa Shigaku, 1989, Vol.124, No.2, pages 384 to 392	1, 2
A	Motoyuki SUGAI et al., "Budo Kyukin ga Sansei suru Yokin Koso", Japanese journal of bacteriology, 1997, Vol.52, No.2, pages 461 to 473	1, 2



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017682

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 3 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl. A61K38/16, 7/16, 7/28, A61P1/02, 31/04 // C12N15/56, 9/24						
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. A61K38/16, 7/16, 7/28, C12N15/56, 9/24						
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの						
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  SwissProt/PIR/GeneSeq, GenbBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS)						
<b>C. 関連すると認められる文献</b>						
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号				
A	AJDIC, D. et al, Genome Sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen, Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, Vol.99, No.22, pp.14434-14439	1, 2				
A	WO 02/77183 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC) 2002. 10. 03, 全文 (ファミリーなし)	1, 2				
A	JP 10-136976 A (株式会社ブルムウォン) 1998. 05. 26, 全文 (ファミリーなし)	1, 2				
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>						
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * 引用文献のカテゴリー            「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの            「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの            「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)            「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献            「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           の日の後に公表された文献            「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの            「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの            「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの            「&amp;」 同一パテントファミリー文献         </td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献					
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">16. 02. 2005</div>	国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">08. 3. 2005</div>					
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;">           特許庁審査官 (権限のある職員)            川口 裕美子         </td> <td style="width: 30%; text-align: center; border: 1px solid black;"> <div style="display: inline-block; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">4C</div> <div style="padding: 0 5px;">3127</div> </td> </tr> <tr> <td colspan="2">           電話番号 03-3581-1101 内線 3451         </td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員) 川口 裕美子	<div style="display: inline-block; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">4C</div> <div style="padding: 0 5px;">3127</div>	電話番号 03-3581-1101 内線 3451	
特許庁審査官 (権限のある職員) 川口 裕美子	<div style="display: inline-block; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">4C</div> <div style="padding: 0 5px;">3127</div>					
電話番号 03-3581-1101 内線 3451						

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	野崎善弘, Streptococcus mutans の産生する菌体外酵素による 口腔レンサ球菌の溶解に関する研究, 神奈川歯学, 1989, Vol24, No. 2, pp. 384-392	1, 2
A	菅井基行 他, ブドウ球菌が産生する溶菌酵素, 日本細菌学雑誌, 1997, Vol. 52, No. 2, pp. 461-473	1, 2

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**